

人源特异性抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的制备及鉴定

耿以如^{1,2},熊四平^{1,2},唐奇²,张晓²,陈雅^{1,2},徐亚如^{1,2},周莹³,仇镇宁²,冯振卿^{1,2*},朱进^{2,4*}

(¹南京医科大学病理学系,²卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 211166;³南京医科大学第二附属医院耳鼻喉科,江苏 南京 210011;⁴南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:利用蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)调节亚基(R 亚基)的二聚体化功能结构域(DDD)的二聚化功能,制备具有中和活性的人源特异性抗狂犬病毒二价抗体。方法:优化合成 linker-C-DDD 序列,设计引物扩增抗狂犬病毒抗体 Fab094 的 Fd 段和轻链可变区序列(V_κ),通过 overlap PCR 将 Fab094 的 Fd 段和 linker-C-DDD 基因重组为 Fd-DDD,将其和 V_κ 分别克隆到真核表达载体中,共转染 293Free style 细胞,表达纯化该抗体。应用 SDS-PAGE、Western blot、ELISA、免疫共沉淀、亲和力测定及免疫荧光试验检测该抗体的免疫学特性,用荧光抗体病毒中和试验检测其中和活性。结果:成功构建了全人源抗狂犬病毒二价抗体 Fab094-DDD 的真核表达载体,获得的二价 Fab094-DDD 抗体与抗原保持着较好的亲和力,能特异性结合狂犬病毒,中和效价为 213.2 U/mg。结论:成功制备了抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体,具有较高的中和活性,为进一步研发狂犬病治疗性抗体药物奠定了基础,对于其他疾病双表位人源特异性抗体的制备也具有借鉴作用。

[关键词] 狂犬病毒;二价抗体;中和活性;双表位抗体

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-693-07

doi:10.7655/NYDXBNS20160610

Generation and characterization of a human neutralizing bivalent antibody Fab094-DDD against rabies virus

Geng Yiru^{1,2},Xiong Siping^{1,2},Tang Qi²,Zhang Xiao²,Chen Ya^{1,2},Xu Yaru^{1,2},Zhou Ying³,Qiu Zhenning²,Feng Zhenqing^{1,2*},Zhu Jin^{2,4*}

(¹Department of Pathology,²Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health,NJMU,Nanjing 211166;³Department of Otolaryngology,the Second Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210011; ⁴Huadong Medical Institute of Biotechniques,Nanjing 210002,China)

[Abstract] **Objective:** We sought to produce a human specific anti-rabies-virus bivalent antibody with neutralizing activity by using the dimer effect of RII's dimerization and docking domain(DDD)in protein kinase A(PKA). **Methods:** Linker-C-DDD sequence was optimized and synthesized. Fd section and light chain variable region(V_κ) of anti-rabies virus Fab094 were amplified. Fd section of Fab094 and linker-C-DDD gene were recombined using overlap PCR. Fd-DDD and V_κ were cloned into eukaryotic expression vectors and both vectors were transfected into 293 free style cells. Fab094-DDD antibody was expressed and purified. The immunological features of Fab094-DDD was detected by SDS-PAGE,Western blot assay,enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA),co-IP,affinity test and indirect immunofluorescence test. The neutralizing activity of Fab094-DDD was detected by fluorescent antibody virus neutralization test. **Results:** The results demonstrated that the eukaryotic expression vectors of the human specific anti-rabies virus bivalent Fab094-DDD antibody were successfully constructed. The antibody effectively recognized the antigen and specifically combined the rabies virus,and the neutralization titer of the antibody was 213.2 U/mg. **Conclusion:** We successfully generated a bivalent Fab094-DDD antibody against rabies virus,and the antibody showed high neutralizing activity. Fab094-DDD antibody could establish the foundation for the treatment of rabies and could be applied to the construction of other bispecific human specific antibodies.

[Key words] rabies virus; bivalent antibodies; neutralizing activity; bispecific antibodies

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(06):693-699]

[基金项目] 国家自然科学基金(81273325,81202370);江苏省社会发展项目(BE2011842)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

狂犬病是一种致死率极高的神经系统疾病^[1], 主要集中于亚洲和非洲国家^[2]。对于狂犬病毒暴露后的治疗, 主要采用抗狂犬病毒免疫球蛋白(rabies immune globulin, RIG) 与狂犬病疫苗免疫接种相结合的方法^[3-4]。临床使用的抗狂犬病毒免疫球蛋白主要来自狂犬病疫苗免疫人或马所获得的抗狂犬病毒血清, 因此抗体产量受到限制且存在安全性隐患。随着基因工程抗体技术的完善和发展, 人源基因工程抗体取代血源性抗体已成为趋势^[4-5]。然而由于病毒抗原突变免疫逃避机制及小分子抗体的缺陷^[6-8], 目前制备的狂犬病毒中和抗体未能达到百分之百的保护作用。研究表明, 双表位人源抗体用于人类疾病治疗具有广泛的应用前景, 其不仅能够与不同的抗原表位特异性结合, 具有高亲和力的特点, 而且能够产生叠加或协同效应, 有效提高抗体阻断病毒与受体结合的能力^[9]。本研究作者已从全人源噬菌体抗体库中筛选出多株高结合活力抗狂犬病毒 Fab 抗体^[10], 本研究拟应用基因工程和抗体工程技术, 制备包含蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 调节亚基的二聚体化功能结构域(DDD)的抗狂犬病毒二价抗体, 为进一步制备双表位人源特异性抗狂犬病毒抗体奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌种和狂犬病毒株

293Free style 细胞、*E.Coli* DH5 α 购自美国 Invitrogen 公司; BHK-21 细胞、狂犬病毒 Flury 株、CVS-11 株由军事医学科学院军事兽医研究所提供, 狂犬病毒 CTN 株由中国科学院武汉病毒研究所提供。

1.1.2 质粒

抗体真核表达载体 pFUSEss-CHIg-hA1、pFUSE2ss-CLIg-hk 购自美国 Invivo Gen 公司; 抗狂犬病毒抗体 Fab094 原核表达载体质粒由南京医科大

学卫生部抗体技术重点实验室制备并保存。

1.1.3 试剂和仪器

293F Expressin 培养基、Opti-MEM 培养基、DMEM 培养基、293 Fectin Transfection Reagent (Invitrogen 公司, 美国); 限制性内切酶 *Age* I、*Nhe* I 和 *Bsiw* I (NEB 公司, 美国), 2 \times PCR master mix (北京优博奥公司), Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA Marker (TaKaRa 公司, 日本), 蛋白 Marker (Bio-Rad 公司, 美国), 质粒小量提取试剂盒 (杭州爱思进生物公司); HRP 标记羊抗人 Fab、FITC 标记抗人 Fab、HRP 标记抗鼠 IgG (武汉博士德生物), 鼠源抗狂犬病毒 G 蛋白抗体 (C86307M, Meridian 公司, 美国); Hitrap Protein L 预装柱 (17-0402-01, GE 公司, 美国), 蛋白纯化系统 (AKTA Purifier 100, GE 公司, 美国), 100 kDa 超滤离心管 (Millipore 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成

根据 Dock-and-Lock (DNL) 方法原理中 DDD 基因序列, 优化合成 linker-C-DDD 序列; 根据抗狂犬病毒抗体 Fab094 的 Fd 段序列和优化合成的 linker-C-DDD 序列设计重链 overlap PCR 引物, 上游引物中引入 *Age* I 位点, 同时插入信号肽, 下游引物中引入 *Nhe* I 位点, 并插入终止子。根据 Fab094 的轻链可变区 (V κ) 序列设计轻链引物, 上游引物中引入 *Age* I 位点, 同时插入信号肽, 下游引物中引入 *Bsiw* I 位点 (表 1)。

1.2.2 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体重组表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Age* I、*Nhe* I 消化抗体真核表达载体 pFUSEss-CHIg-hA1, 限制性内切酶 *Age* I、*Bsiw* I 消化真核表达载体 pFUSE2ss-CLIg-hk。分别以 Fab094 和 linker-C-DDD 为模板, 使用设计合成的引物扩增 Fab094 的 Fd 段、V κ 和 linker-C-DDD 基因, 通过 overlap PCR, 将 Fd 和 linker-C-DDD 重

表 1 PCR 所用引物序列
Table 1 PCR primer sequences

目的基因	引物序列(5'→3')
抗体重链 (overlap PCR 引物)	F 5'-ACCGGTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTCAGTTGGCTCTTTCTCGTGGCAATCCTC AAGGGGTGCAGTGTGAAGTGCAGCTGCTGTCAGTCT-3'
	Fm 5'-CGTAGACGGTTTCGAAATTCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGT-3'
	Rm 5'-ACTAGTGGCCAGGCCGGCCAGGAATTTCCGAAACCGTCTACG-3'
	R 5'-GCTAGCTTACGCACGGGCTTACGCAGACGGGT-3'
	F 5'-ACCGGTGCCACCATGGACATGCGGGTTCCAGCCCAGCTTCTCGGACTTCTGCTGTTG TGGCTGCGCGGAGCACGGTGGCAGATCCAGATGACCCAGTCT-3'
抗体轻链	R 5'-CGTACGTTTGATTTCCACTTTGTTGCCCGCCG-3'

组连接为 Fd-DDD, Fd-DDD 和 V κ 分别通过双酶切, 与抗体重、轻链真核表达载体连接, 连接产物转化 *E. Coli DH5 α* 后, 筛选阳性克隆并酶切鉴定, 对鉴定正确的克隆送南京金斯瑞公司测序以确认序列连接正确。

1.2.3 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的表达和纯化

将测序正确的 200 μ L pFUSEss-CHlg-hA1-Fd-DDD (250 μ g/mL) 和 200 μ L pFUSE2ss-CLlg-hk-V κ (250 μ g/mL) 重组质粒转染至 100 mL 293Free style (293F) 细胞中, 将细胞置于 CO₂ 摇床培养箱中培养, 培养条件为: CO₂ 体积分数为 8%, 转速为 120 r/min, 培养温度为 37 $^{\circ}$ C。120 h 后收集细胞培养上清。收集的细胞上清和细胞沉淀裂解物用 Western blot 检测, 通过 SDS-PAGE 电泳转膜, 用 HRP 标记羊抗人 Fab 抗体 (1:3 000) 孵育, 通过化学发光系统检测。细胞上清经过滤后使用蛋白纯化系统和 Hi-trap Protein L 预装柱, 按标准操作步骤纯化。纯化后使用 100 kDa 超滤离心管置换抗体缓冲液并浓缩, 使用 One Drop 分光光度计测定浓度后分装, SDS-PAGE 分析鉴定。

1.2.4 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体非变性电泳检测

将纯化后的抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体约 5 μ g 加 2 \times 非变性上样缓冲液 (不含 SDS 和 β -巯基乙醇), 不经煮样变性, 直接上样于普通 SDS PAGE 上进行电泳。

1.2.5 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体免疫学特性分析

ELISA 检测: 灭活狂犬病毒 CTN 株裂解蛋白 (RABV) 包被 ELISA 板 (50 ng/孔) 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 清洗后用 5% 脱脂奶粉封闭, 100 μ L/孔, 放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 2 h; 分别加入二价 Fab094-DDD 抗体和 Fab094 抗体以梯度稀释 (1 \times 2⁻⁷~1 \times 2⁻¹ μ g/mL), 以 anti-trop2 (无关抗体) 为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBST 清洗 4 次后, 加入 HRP 标记羊抗人 Fab (1:3 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 清洗 8 次, 拍干; 加入 TMB 显色, 室温反应 5 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 以终止反应, 酶标仪读数测定 450 nm 的吸光值。

免疫共沉淀检测: 将 10 μ L RABV 与 5 μ g 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体混合, 用 PBS 定容到 300 μ L, 4 $^{\circ}$ C 共孵育 2 h, 加入 Protein L 免疫磁珠, 继续孵育过夜。离心 10 min 去除上清, 用 PBST 清洗 5 遍后, 加入 50 μ L 柠檬酸洗脱液, 离心并收集上清, 加入 10 μ L Tris-base 中和上清液。通过 SDS-PAGE

电泳转膜, 用鼠源抗狂犬病毒 G 蛋白抗体 (1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBST 清洗后用 HRP 标记抗鼠 IgG 抗体 (1:3 000) 孵育 1 h, 通过化学发光系统检测。

亲和力检测: 使用 pH7.4 的结合缓冲液稀释二价 Fab094-DDD 抗体, 浓度至 50.0、10.0、2.0、0.4 μ g/mL, 分别结合到 Protein L 探针传感器上。用结合缓冲液稀释 RABV 至 50 μ g/mL, 与各浓度抗体分别结合, 设置抗体与探针结合时间, 抗原与抗体结合时间均为 300 s, 采用 BLItz 分子间相互作用系统分析二价 Fab094-DDD 抗体的亲和力。

免疫荧光检测: 将 BHK-21 细胞培养于 6 孔板中, 使细胞附着板底, 24 h 后用狂犬病毒 Flury 株感染上述 BHK-21 细胞; 同时设阴性对照孔, 即不感染病毒。感染 72 h 后用 PBS 清洗 3 次, 分别加入稀释的抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体, 室温孵育 2 h 后, 用 PBST 清洗 3 次, 加入 FITC 标记的抗人 Fab 二抗 (1:1 000), 室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 5 次后加入 DAPI (1 g/L) 工作液, 室温避光孵育 10 min, PBS 冲洗; 荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.6 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的体外中和活性检测

抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的中和活性使用 BHK-21 细胞和 CVS-11 狂犬病毒株, 采用荧光抗体中和试验 (fluorescent antibody virus neutralization test, FAVN) 完成。FAVN 为世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 推荐的狂犬病毒中和抗体检测方法, 用 96 孔细胞培养板, 以 4 行 \times 12 列为 1 个样品检测区 (即 4 个复孔), 将 Fab094-DDD 用标准培养基 3 倍等比稀释加入培养板中, 每孔加入 100 倍细胞半数感染量 (TCID₅₀) 的狂犬病毒 CVS-11 株, 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。再加入约 2 \times 10⁴ 个 BHK-21 细胞, 孵育 48 h。PBS 清洗后用 80% 丙酮固定细胞, 加入荧光标记的抗狂犬病毒 N 蛋白单抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 在 100 倍荧光显微镜下观察。

1.3 统计学方法

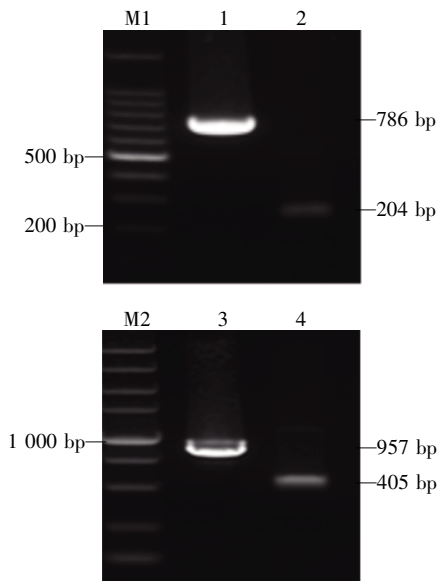
应用 Stata8.0 软件对资料进行分析, 实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较采用 *t* 检验。P \leq 0.05 表示各组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体重组表达载体的构建及鉴定

采用 PCR 分别扩增出长度 786 bp 的 Fd 基因

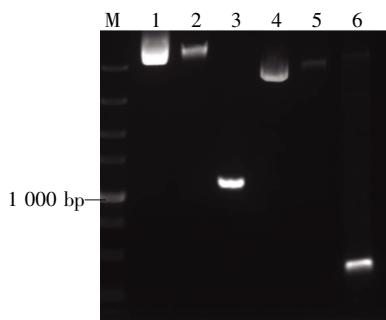
和 204 bp 的 linker-C-DDD 基因(图 1),通过 overlap PCR 扩增出长度为 957 bp 的 Fd-DDD 基因,同时扩增出长度为 405 bp 的 V κ 基因(图 1),分别与线性化的 pFUSEss-CHIg-hA1 和 pFUSE2ss-CLIg-hk 质粒连接,完成质粒重组(图 2)。重组后的质粒转入 DH5 α 后,挑选阳性克隆送公司测序,证实与设计序列完全相同。



M1:100 bp DNA Ladder Marker;M2:DL5 000 DNA Marker;1:094Fd;2:linker-C-DDD;3:094Fd-DDD;4:094V κ 。

图 1 抗狂犬病毒二价抗体 Fab094-DDD 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of anti-RABV Fab094-DDD gene PCR products



M:DL5 000 DNA Marker;1:pFUSEss-CHIg-hA1 质粒;2:pFUSEss-CHIg-hA1 质粒+Fd-DDD;3:Fd-DDD;4:pFUSE2ss-CLIg-hk 质粒;5:pFUSE2ss-CLIg-hk 质粒+V κ ;6:V κ 。

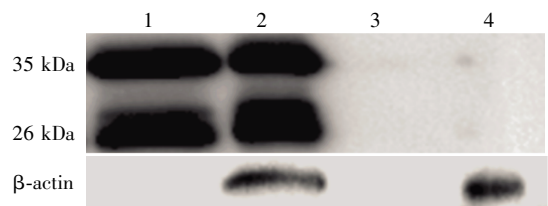
图 2 重组抗狂犬病毒二价抗体 Fab094-DDD 重链及轻链表达质粒的构建及鉴定

Figure 2 Construction and identification of the recombinant expression plasmids with anti-RABV Fd-DDD/ V κ

2.2 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的表达和纯化

2.2.1 Western blot 检测

用 HRP 标记抗人 Fab 抗体对转染后细胞上清和细胞沉淀裂解物进行 Western blot 检测,显示在 26、35 kDa 处均有特异性条带,正常细胞上清和细胞沉淀裂解物没有特异条带(图 3)。分子量大小正确,表明在转染的 293F 细胞上清和细胞沉淀中均有 Fab094-DDD 抗体轻、重链的表达。



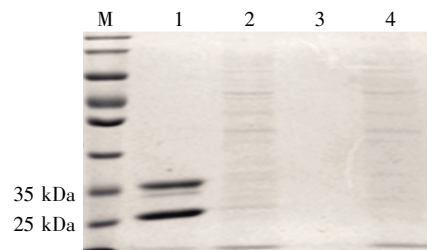
1:转染后 293F 细胞上清;2:转染后 293F 细胞沉淀裂解物;3:未转染的 293F 细胞上清;4:未转染的 293F 细胞沉淀裂解物。

图 3 Western blot 鉴定抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体在 293F 细胞中表达

Figure 3 Identification of antibody by Western blot assay

2.2.2 SDS-PAGE 检测

使用 293F 表达系统真核表达抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体,于转染后 120 h 收集细胞培养上清,使用 AKTA 蛋白纯化系统和 Protein L 亲和层析柱纯化抗体。纯化后的抗体使用 SDS-PAGE 分析,考马斯亮蓝染色结果显示(图 4),纯化后的抗体纯度较高。



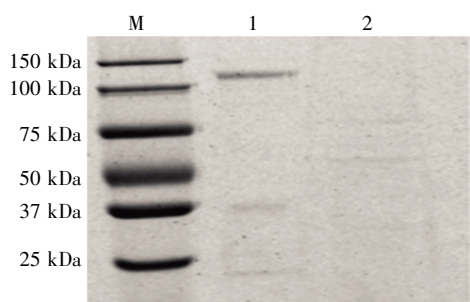
M:蛋白 Marker; 1:纯化后 Fab094-DDD;2:纯化前细胞上清;3:未转染的 293F 细胞上清;4:流穿液。

图 4 纯化后抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的 SDS-PAGE 检测

Figure 4 SDS-PAGE analysis of purified anti-RABV Fab094-DDD antibody

2.2.3 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体非变性电泳检测

纯化后的 Fab094-DDD 抗体经非变性电泳检测,结果显示在 120 kDa 大小处有目的条带,而 60 kDa 处无明显条带(图 5),说明在非变性条件下为二价抗体。



M:蛋白 Marker; 1:纯化后 Fab094-DDD;2:未转染的 293F 细胞上清。

图 5 Fab094-DDD 非变性电泳检测

Figure 5 SDS-PAGE analysis of native purified anti-RABV Fab094-DDD antibody

2.3 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的免疫学特性鉴定

2.3.1 ELISA 检测

用 RABV 包被 ELISA 板(50 ng/孔),间接 ELISA 法检测抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的效价。结果显示,抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体与 RABV 可特异性结合,具有较好的量效关系(图 6),

且其效价高于 Fab094。

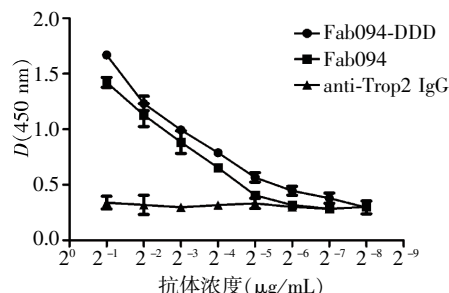


图 6 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的 ELISA 检测

Figure 6 ELISA analysis of the binding activity of anti-RABV Fab094-DDD antibody

2.3.2 亲和力检测

将 RABV 蛋白用缓冲液稀释到 50 μg/mL, Fab094-DDD 抗体稀释成 50.0、10.0、2.0、0.4 μg/mL 4 个浓度梯度,采用 BLItz 分子间相互作用系统分析二价 Fab094-DDD 抗体的亲和力 KD 为 1.173×10^{-8} mol(图 7)。

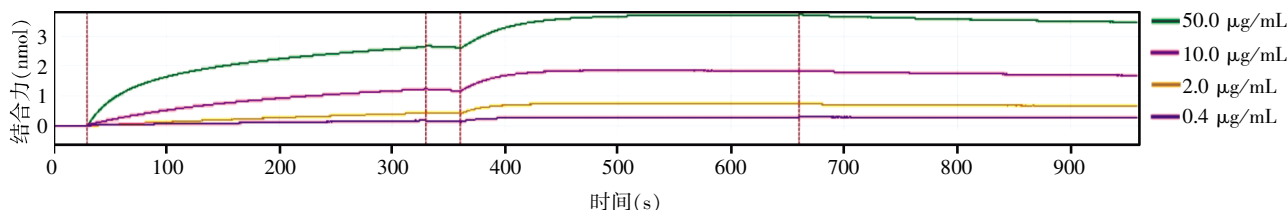


图 7 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的亲和力检测

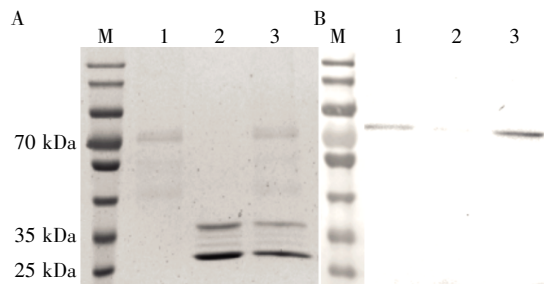
Figure 7 Affinity detection of anti-RABV Fab094-DDD antibody

2.3.3 免疫共沉淀

抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体与 RABV 免疫共沉淀后,SDS-PAGE 检测,在 67 kDa 处有蛋白条带(图 8A),Western blot 检测(图 8B)与 SDS-PAGE 结果一致,表明 67 kDa 处的条带为狂犬病毒 G 蛋白,二价 Fab094-DDD 抗体能与之特异性结合。

2.3.4 免疫荧光检测

为进一步验证抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体与狂犬病毒的结合能力,将抗体与狂犬病毒 Flury 株感染的 BHK-21 共孵育,加入 FITC 标记抗人 Fab 二抗,结果显示狂犬病毒感染的细胞呈现绿色荧光,而未被病毒感染的细胞无绿色荧光(图 9)。说明该抗体可以与狂犬病毒特异性结合。



A:SDS-PAGE 结果;B:Western blot 结果。1:RABV; 2:Fab094-DDD; 3:Fab094-DDD+RABV。

图 8 Fab094-DDD 的免疫共沉淀检测

Figure 8 Immunoprecipitation analysis of anti-RABV Fab094-DDD antibody

2.4 抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体的中和活性检测

在 FAVN 中,培养孔内有不少于 1 个荧光细胞的记为阳性,无荧光细胞的记为阴性。以标准抗狂犬病血清(30 U/mL)作为对照,使用 Spearman-Kärber 方法^[11],根据稀释比例和阴性孔总数,计算出二价 Fab094-DDD 抗体的中和活性效价为 213.2 U/mg。

3 讨论

狂犬病是由狂犬病毒所致的自然疫源性人畜共患急性传染病^[12]。一旦发病,病死率几乎是 100%^[2]。目

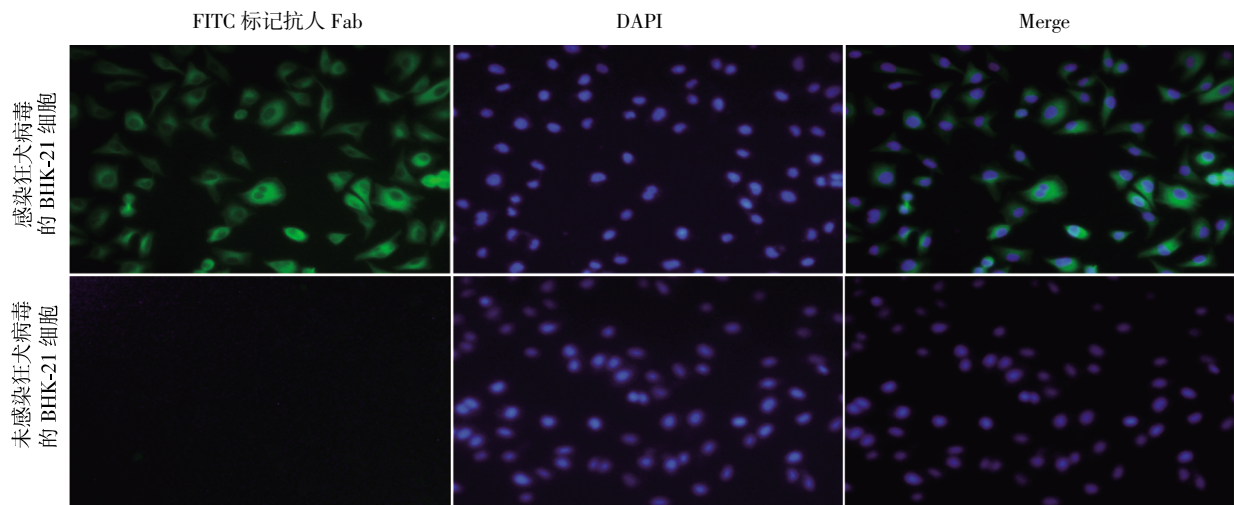


图 9 免疫荧光检测 Fab094-DDD 与狂犬病毒的特异性结合

Figure 9 Combination of anti-RABV Fab094-DDD antibody with rabies virus by immunofluorescence microscopy($\times 400$)

前临床上主要使用人抗狂犬病毒血清和马抗狂犬病毒血清用于狂犬病的被动免疫,但人抗狂犬病毒血清生产成本低,产量低,往往供不应求,而马抗狂犬病毒血清可能产生异种蛋白导致的过敏反应和血液疾病^[13-14]。利用现代基因工程和分子生物学技术,可制备具有高亲和力、高特异性的人源抗狂犬病毒中和抗体来替代现有的血液制品。

人源抗狂犬病毒中和抗体具有安全性好、保护力强、特异性高、用量少、成本低、可大量生产等优点^[15-16],临床应用前景非常广阔。但是小分子单价抗体在血清中半衰期较短、亲和力及中和活性相对全分子或二价抗体低;另外,由于单价抗体针对一个特定抗原表位,病毒可能通过蛋白糖基化改变或隐蔽其识别位点或利用空间结构的位阻效应逃避中和抗体的识别,使得抗狂犬病毒抗体不能有效发挥其对病毒感染的阻断作用^[6-7]。近年来有研究者提出二价抗体具有半衰期长、亲和力高、可能针对不同抗原表位、有效提高抗体中和活性等优点^[17-18]。但无论是利用混合杂交瘤技术或是通过化学偶联完整抗体分子的方法,都难以获得一定数量和纯度的二价抗体^[9]。研究表明 PKA 的 R 亚基二聚化功能结构域(DDD)具有二聚化功能,可自发形成稳定二聚体结构,从而获得高纯度二价抗体,本研究即利用 DDD 的这一特征来制备抗狂犬病毒二价抗体。

本课题组已从构建的噬菌体抗体库中筛选出多株高结合活力的抗狂犬病毒 Fab 抗体,其中 1 株 Fab094 经检测可与狂犬病毒特异性结合,中和效价为 200.11 U/mg,动物实验表明其对感染狂犬病毒的小鼠有明显保护作用^[10]。本研究以 Fab094 为模

板扩增出 405 bp 的轻链可变区序列和 786 bp 的重链 Fd 段序列,应用基因抗体工程和分子生物学技术构建 Fab094-DDD 表达载体,在 293F 细胞中表达,经过蛋白纯化系统获得高纯度的抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体。非变性 PAGE 电泳结果显示,在 120 kDa 大小处有目的条带,而 60 kDa 处无明显条带(图 5),证明在非变性条件下 Fab094-DDD 以二聚体形式稳定存在,为二价抗体;经多种方法鉴定,该二价抗体具有与狂犬病毒特异性结合的能力,ELISA 结果显示其效价高于单价抗体 Fab094 ($P < 0.05$);对狂犬病毒的中和效价是 213.2 U/mg,高于单价抗体 Fab094。本研究结果提示成功制备了抗狂犬病毒二价 Fab094-DDD 抗体,具有较高的中和活性,为进一步研发狂犬病治疗性抗体药物奠定了基础,对于其他疾病双表位人源特异性抗体的制备也具有借鉴作用。

抗体缺乏 Fc 段将无法产生抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和补体介导的细胞裂解作用,从而影响抗体的病毒中和作用和病毒清除能力^[8]。本研究利用 PKA 的 R 亚基 DDD 结构域与 PKA 锚定蛋白的锚定区(AD)相互作用的特性,进一步将二价 Fab094-DDD 抗体作为 1 对连接模块,同时通过引入半胱氨酸,促使 DDD 和 AD 之间形成二硫键,连接另一针对不同抗原表位的全分子抗狂犬病毒抗体 IgG,构建双表位人源特异性三价或六价抗体复合物^[17,19]。目前中和不同抗原表位的狂犬病毒往往采用多株单抗混合使用的方法^[20],而利用 DNL 方法可制备针对不同抗原表位的高效多价抗体,目前运用这一方法已成功制备了抗胰腺癌、淋

巴瘤抗体复合物等治疗性抗体药物,与其亲本抗体相比,肿瘤抑制率增加 100 倍左右^[21-22]。双表位人源抗体既可以克服小分子抗体的不足,又可针对不同抗原表位,显著提高抗体的中和活性,这将为狂犬病的防治提供一个新颖、高效的候选抗体药物。

[参考文献]

- [1] Li C,Zhang F,Lin H,et al. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2011,32(3): 329-337
- [2] Yamada K,Noguchi K,Komono T,et al. Efficacy of favipiravir(T-705)in rabies post-exposure prophylaxis[J]. *J Infect Dis*,2015,213(8): 1253-1261
- [3] 张倩倩,赵 茜,张 晓,等. 全人源抗狂犬病病毒 G 蛋白单链抗体制备及中和活性鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2013,33(7):927-931
- [4] Liu XJ,Liu QQ,Feng XM,et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation[J]. *Trop Biomed*,2011,28(1): 138-148
- [5] Jackson AC. Current and future approaches to the therapy of human rabies[J]. *Antiviral Res*,2013,99(1):61-67
- [6] Goudsmit J,Marissen WE,Weldon WC,et al. Comparison of an anti-rabies human monoclonal antibody combination with human polyclonal anti-rabies immune globulin[J]. *J Infect Dis*,2006,193(6): 796-801
- [7] Muhamuda K,Madhusudana SN,Ravi V. Use of neutralizing murine monoclonal antibodies to rabies glycoprotein in passive immunotherapy against rabies[J]. *Hum Vaccin*,2007,3(5): 192-195
- [8] Ye CT,Choi JG,Abraham S,et al. Human macrophage and dendritic cell-specific silencing of high-mobility group protein B1 ameliorates sepsis in a humanized mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2012,109(51): 21052-21057
- [9] Sharkey RM,Rossi EA,Mcbride WJ,et al. Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy[J]. *Semin Nucl Med*,2010,40(3): 190-203
- [10] Liu X,Lin H,Tang Q,et al. Characterization of a human antibody fragment Fab and its calcium phosphate nanoparticles that inhibit rabies virus infection with vaccine[J]. *PLoS One*,2011,6(5): e19848
- [11] Cliquet FA,Sagné L. Development of a fluorescent anti-body virus neutralisation test (FAVN test)for the quantitation of rabies-neutralising antibody[J]. *J Immunol Methods*,1998,212(1):79-87
- [12] Zhang G,Wang H,Mahmood F,et al. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms [J]. *Vet Microbiol*,2013,162(2/4):601-613
- [13] Bakker AB,Python C,Kissling CJ,et al. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus:safety,tolerability,and neutralizing activity [J]. *Vaccine*,2008,26(47):5922-5927
- [14] Satpathy DM,Sahu T,Behera TR. Equine rabies immunoglobulin;a study on its clinical safety[J]. *J Indian Med Assoc*,2005,103(238):241-242
- [15] Keller MA,Stiehm ER. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases[J]. *Clin Microbiol Rev*,2000,13(4):602-614
- [16] De Kruijff J,Bakker AB,Marissen WE,et al. A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis [J]. *Annu Rev Med*,2007,58(2): 359-368
- [17] Goldenberg DM,Rossi EA,Sharkey RM,et al. Multifunctional antibodies by the dock-and-lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting[J]. *J Nucl Med*,2008,49(1): 158-163
- [18] Rossi EA,Rossi DL,Cardillo TM,et al. Preclinical studies on targeted delivery of multiple IFN {alpha}2b to HLA-DR in diverse hematologic cancers [J]. *Blood*,2011,118(7): 1877-1884
- [19] Chang CH,Rossi EA,Goldenberg DM. The dock and lock method;a novel platform technology for building multivalent,multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity[J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(18 Pt 2):5586s-5591s
- [20] Orum H,Andersen PS,Oster A,et al. Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage[J]. *Nucleic Acids Res*,1993,21(19): 4491-4498
- [21] Chang CH,Hinkula J,Loo M,et al. A novel class of Anti-HIV agents with multiple copies of enfuvirtide enhances inhibition of viral replication and cellular transmission *in vitro*[J]. *PLoS One*,2012,7(7): e41235
- [22] Rossi EA,Goldenberg DM,Cardillo TM,et al. Novel designs of multivalent anti-CD20 humanized antibodies as improved lymphoma therapeutics[J]. *Cancer Res*,2008,68(20): 8384-8392

[收稿日期] 2016-02-16